Aus dem Institut für Parasitologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. J. Boch

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE MÖGLICHKEIT DER GEFRIERKONSERVIERUNG VON INFEKTIONSLARVEN VERSCHIEDENER HAUSTIERNEMATODEN SOWIE DEREN LEBENSDAUER BEI VARIABLEN TEMPERATUREN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Antje Meyer - Golling
Tierärztin aus Neuruppin

Berlin 1966
Journal Nr. 536

Aus dem Institut für Parasitologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. J. Boch

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE MÖGLICHKEIT DER GEFRIERKONSERVIERUNG VON INFEKTIONSLARVEN VERSCHIEDENER HAUSTIERNEMATODEN SOWIE DEREN LEBENSDAUER BEI VARIABLEN TEMPERATUREN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Antje Meyer - Golling
Tierärztin aus Neuruppin

Berlin 1966
Journal Nr. 536

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Dekan: Prof. Dr. J. Boch
Referent: Prof. Dr. J. Boch
Korreferent: Prof. Dr. G. Wittke

Tag der mündlichen Prüfung: 12.7.66

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	2
II.	Möglichkeiten der Gefrierkonservierung von Parasiten und die Widerstandsfähigkeit infektionstüchtiger 3. Larven verschiedener Haustier-Nematoden (anhand der Literatur)	3
III.	Eigene Untersuchungen	11
	A. Material und Methodik	11
	B. Ergebnisse	
	1. Möglichkeit der Gefrierkonservierung von Infektionslarven parasitischer Nematoden	14
	2. Lebensdauer dieser Larven im Kot bei verschiedenen Temperaturen	23
IV.	Besprechung der Ergebnisse	29
V.	Zusammenfassung	35
VI.	Literaturverzeichnis	36
	Lebenslauf	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546527_0041

I. Einleitung

Der Befall mit Wurmparasiten kann Verluste vor allem bei Jungtieren verursachen und die Wirtschaftlichkeit einer Viehhaltung in Frage stellen. Obgleich neue Bekämpfungsmittel und Behandlungsverfahren entwickelt wurden, sind Parasitosen unter unseren klimatisch günstigen Bedingungen in manchen Weidegebieten noch ein großes Problem. Neben der medikamentellen Behandlung der befallenen Tiere versucht man gleichzeitig, die Möglichkeiten von Neuinfektionen zu verringern. Die hierfür notwendigen Freiland- und Laborversuche könnten durch eine Gefrierkonservierung des zur Infektion notwendigen Larvenmaterials, wie sie bereits bei einer größeren Zahl von parasitischen Protozoen üblich ist, wesentlich erleichtert werden.

Ich erhielt daher die Aufgabe, die Gefrierkonservierung von Infektionslarven verschiedener Haustiernematoden zu versuchen und deren Lebensdauer bei variablen Temperaturen zu prüfen.

II. Möglichkeiten der Gefrierkonservierung von Parasiten und die Widerstandsfähigkeit infektionstüchtiger 3. Larven verschiedener Haustier-Nematoden (anhand der Literatur)

Bei der Suche nach Literatur über die Möglichkeit der Gefrierkonservierung von Parasitenstadien finden sich positive Angaben nur über Protozoen, während anscheinend Metazoen trotz optimaler Berücksichtigung von Medium, Temperatur und Art des Tiefgefrierens große Schwierigkeiten machen.

Schon seit langer Zeit weiß man, daß sich bestimmte Zellen und Gewebe auf sehr tiefe Temperaturen abkühlen lassen, ohne dadurch wesentlich geschädigt zu werden. Schon 1897 kühlte sie DOVENPORT (zit. POLGE und PARKES, 1952) auf -17°C ab. Nach JAHNEL (1938) verlieren sie sogar bei -79°C und bei -192°C ihre Lebensfähigkeit nicht. Nachdem SMITH und POLGE (195o) die Konservierung von Spermien unter Zusatz von Glyzerin bei -79°C gelang, erzielte man auch gute Erfolge bei der Konservierung von Protozoen (Mc. ENTEGART, 1954; HOPPENRATH, 1956; REUSSE, 1956; BEMRICK, 1961; CUNNINGHAM, LUMSDEN und WEBBER, 1963; BARNETT, 1964; sowie ROBL, 1965).

Untersuchungen von DOUGHERTY (1962), NAGINGTON und GREAVES (1962), PORTERFIELD und ASHWOOD-SMITH (1962) sowie PERSIDSKY und RICHARDS (1963) haben gezeigt, daß Zellen in Glyzerin und Dimethylsulfoxid sich am besten halten, wenn die Temperatur um 1°C pro Minute bis auf -25°C reduziert und dann schnell auf unter -50°C abgekühlt wurde . KITE und DOEBBLER (1962) froren mit gleichem Erfolg Zellen ein, indem sie Abkühlraten von 1°C bis 50°C pro Minute benutzten.

Das langsame Einfrieren hat sich auch bei der Konservierung von Protozoen bewährt. REUSSE (1956) erreichte die Konservierung verschiedener tierpathogener Protozoen, indem er sie in Ampullen einschmolz und 3o Minuten lang bei +4°C aufbewahrte. Das Einfrieren erfolgte im Alkoholbad (95%) unter Zugabe von Trockeneis. Hierdurch erreichte er

eine Abkühlrate von 1o°C pro Minute. Bei -2o°C brachte er die Proben in die Tiefkühltruhe. ROBL (1965) erprobte verschiedene Methoden zur Konservierung von Toxoplasmen bei 18-2o°C (Zimmertemperatur), bei +4°C (Kühlschranktemperatur), bei -18 bis-2o°C sowie bei -76°C. Die besten Erfolge hatte er beim langsamen Einfrieren, wo Toxoplasmen über 2oo Tage lang lebensfähig blieben. Eine ähnliche Methode wurde auch von WEINMAN und MC ALLISTER (1947) für Trypanosomen, Trichomonaden und Leptospiren, MC ENTEGART (1954) für Trichomonaden, POLGE und SOLTYS (1957) für Trypanosomen, BEMRICK (1961) für Lamblien sowie WALKER und ASHWOOD-SMITH (1961) für Trypanosomen mit gutem Erfolg angewandt.

Zum Auftauen der Ampullen benutzten LOVELOCK und BISHOP (1959) ein Wasserbad von +35°C,ASHWOOD-SMITH (1961), PORTERFIELD und ASHWOOD-SMITH (1962), NAGINGTON und GREAVES (1962), PERSIDSKY und RICHARDS (1963) sowie ROBL (1965) ein solches von +37°C. Demgegenüber verwendeten WEINMAN und MC ALLISTER (1947) ebenso wie MC ENTEGART (1954) Wasserbäder von 4o-42°C, POLGE und SOLTYS (1957) von 15-2o°C. BEMRICK (1961) schließlich ließ seine bei -7o°C gelagerten Proben bei Zimmertemperaturen auftauen.

POLGE, SMITH und PARKES (1949) berichteten als erste über die schützende Wirkung von 5-15% Glyzerin als Einbettungsmedium beim Einfrieren und Auftauen von Spermien. 1959 entdeckten LOVELOCK und BISHOP, daß Dimethylsulfoxyd (DMSO) lebende Zellen ebenso schützt wie Glyzerin. Es dringt schneller in die Zellen ein und ist auch für glyzerinundurchlässige Organismen geeignet. MC ENTEGART (1954) fror Trichomonaden unter Zusatz von 1o%igem Glyzerin ein. POLGE und SOLTYS (1957) benutzten bei der Konservierung von Trypanosomen 5, 1o und 2o%iges Glyzerin. Optimale Ergebnisse erzielten sie ebenfalls mit 1o% Glyzerin. BEMRICK (1961) erreichte mit Lamblien die besten Erfolge bei -7o°C und 5o%igem Glyzerin. BARNETT (1964) konnte Babesia bigemina in 7%igem Glyzerin über 72o Tage lang am Leben erhalten. ROBL (1965) gelang es, Toxoplasma-Trophozoiten unter Zusatz von

5 und 1o% Glyzerin über 2oo Tage infektiös zu erhalten.

LOVELOCK und BISHOP (1959) froren Erythrozyten von Mensch und Rind und Bullensperma unter Zusatz von 2%, 5%, 1o% und 15% Glyzerin bzw. Dimethylsulfoxyd ein. Die Ergebnisse waren besser mit Glyzerin. Nach WALKER und ASHWOOD-SMITH (1961) bewährten sich 5%- und 1o%iges DMSO sowie 1o%iges Glyzerin in gleicher Weise bei der Konservierung von Trypanosomen. In den Versuchen von DOUGHERTY (1962) erwiesen sich DMSO-Konzentrationen zwischen 7,5% und 12,5% dem Glyzerin weit überlegen, da im ersten Falle über 9o%, im zweiten nur 18% der Zellen überlebten.

Angaben über die Gefrierkonservierung von parasitischen Helminthen fand ich lediglich bei WEINMAN und MC ALLISTER (1947), die infektiöse Ancylostoma caninum- und Strongyloides simiae-Larven in Leitungswasser bei -15 und -7o°C maximal 49 bzw. 1o7 Tage lang einfroren. 1% der A.caninum-Larven überlebte bei -15°C den längsten Untersuchungszeitraum und war imstande, einen Hund zu infizieren. Str. simiae-Larven vertrugen Temperaturen von -7o°C besser. Nach 49 Tagen fanden die Verfasser noch 5o% bewegliche Larven. Umso zahlreicher, ja fast nicht mehr ganz überschaubar sind die in der in- und ausländischen Literatur verstreuten Angaben über die Lebensdauer von Magendarmwurm- und Metastrongylidenlarven. Im folgenden sollen die wesentlichsten Arbeiten lediglich über jene Helminthen kritisch zusammengestellt werden, welche ich in meinen Versuchen verwendete.

Über die präparasitischen Stadien von Haemonchus contortus gibt es eine Fülle von Untersuchungsergebnissen. RANSOM (zit. KATES, 195o) fand, daß diese Schafparasiten auf Weiden 237 Tage lang lebensfähig blieben und zu einem geringen Teil überwinterten. BAKER (1939) beobachtete in der Gegend von New York auf Weiden nach einem Jahr, Mönnig (193o) in Südafrika trotz sehr trockenen Wetters an geschützten Stellen nach 91/2 Monaten lebende Larven.

Eine Überwinterung von Haemonchus contortus-Larven sahen DIKMANS und ANDREWS (1933) sowie KATES (1943) in

Beltsville, während SARLES (1943), SHORB (1943, 1944) und DINABURG (1944) in derselben Gegend keine überlebenden Larven feststellten. GRIFFITHS (1937) und SWALES (1940) verneinen für Südkanada ebenfalls das Verseuchtbleiben der Weiden. KATES (1950) ist der Meinung, daß Haemonchus-Larven wenig widerstandsfähig sind und infizierte Weiden in Gebieten mit Wintertemperaturen unter dem Gefrierpunkt im folgenden Frühjahr keine Ansteckungsquelle darstellen. Eine Überwinterung halten auch REINECKE (1960) in Südafrika und HELLE (1963) in Norwegen für ausgeschlossen.

WETZEL (1945) berichtet von Freilandversuchen. Er infizierte im Herbst 1943 eine Wiese zum Teil künstlich, zum Teil durch wurmbefallene Schafe mit Haemonchus-Larven. Die Weide ruhte bis zum Mai 1944, dann erfolgte die Probeentnahme. Larven wurden nur auf dem künstlich infizierten Teil in kleiner Anzahl gefunden, allerdings lagen die Wintertemperaturen nur zwischen 16°C und -2°C. ERHARDOVA (1962) prüfte die Widerstandsfähigkeit der Larven in der CSSR. Auch wenn einige Haemonchus contortus-Larven den Winter bei teilweise Temperaturen von -30°C überlebten, waren sie im April nicht mehr infektionstüchtig. Sehr eingehende Freilandversuche führte ROSE (1963a, 1964, 1965) durch, aus denen doch die Möglichkeit der Überwinterung einwandfrei erwiesen erscheint.

Ostertagia-Larven des dritten Stadiums scheinen gegenüber Umwelteinflüssen besonders widerstandsfähig zu sein. Nach FURMAN (1944) überlebten in Laborversuchen infektiöse Ostertagia circumcincta-Larven mehr als 271 Tage. DINABURG (1945) beobachtete eine deutliche Resistenz gegenüber den üblichen Wintertemperaturen. Auch GRIFFITHS (1937) berichtet von Neuinfektionen von Schafen im Frühjahr auf kanadischen Weiden. Ähnlich sind die Ergebnisse von SWALES (1940) in Ostkanada, BESSONOW (1958) in West Kasakhstan, KATES (1943, 1950) in Maryland und von ROSE (1965) in Südengland, GOLDBERG und RUBIN (1956), ROSE (1961) sowieGOLDBERG und LUCKER (1963) führten Versuche mit Ostertagia ostertagi-Larven durch. Nach den Untersuchungen von ROSE (1961) überlebten die dritten Larven maximal auf der Weide beinahe zwei

Jahre, im Labor in Wasser bei 6-7°C sogar 134 Wochen, bei -6°C 14 Wochen. Desgleichen fand ERHARDOVA (1962) von September bis Mai überlebende dritte Larven von O. circumcincta und O. ostertagi, obwohl in diesem Jahr Temperaturen bis zu -3o°C herrschten. Auch SCHWINK (1963) bestätigt die Überwinterung von Ostertagia-Larven auf in verschiedenen Meereshöhen gelegenen Grasparzellen in Wyoming.

MÖNNIG (193o) untersuchte in Südafrika die Einwirkungen natürlicher und experimenteller Bedingungen auf Eier und Larven der Trichostrongylusarten. Larven III überlebten lo-tägiges Gefrieren. In Wasser waren sie bei Zimmertemperaturen sieben Monate lang lebensfähig. Dies wurde 1961 von ALTAEV bestätigt. NEKIPELOVA (1956) gibt die Überlebenszeit von Trichostrongylidenlarven mit 18o bis 33o Tagen an. Eine sehr ausführliche Arbeit veröffentlichte TAYLOR bereits 1938 in England, wonach alle Schaftrichostrongylidenlarven auf offenen Grasparzellen nach 39 Wochen abgetötet waren. CROFTON (1948) erzielte mit Trichostrongylus retortaeformis ähnliche Ergebnisse (2o Wochen), wobei er dem Einfluss der jeweiligen Luftfeuchtigkeit eine besondere Bedeutung zuschreibt. Eine Überwinterung von Tr. colubriformis-Larven halten GRIFFITHS (1937) und SWALES (194o) in Kanada, ROSE (1965) in Südengland, KATES (1943, 195o) sowie GOLDBERG und LUCKER (1959) in Beltsville für unwahrscheinlich. Ähnliche Beobachtungen teilen SEGHETTI (1948), WETZEL (1945) und HELLE (1963) mit.

Im Gegensatz zu den im allgemeinen übereinstimmenden Ergebnissen bei Haemonchus und Trichostrongylus scheint die Überlebensdauer der verschiedenen Cooperiaarten recht unterschiedlich zu sein. Von Cooperia curticei fanden DINABURG (1945) und KATES (1943, 195o) in Beltsville keine überwinternden Larven. SHORB (1942) stellte während des Sommers in der gleichen Gegend als maximale Überlebensdauer 3 1/2 Monate fest. SWALES (194o) in Ostkanada und auch HELLE (1963) in Norwegen verneinen eine Infektiosität der Weiden im Frühjahr.

Cooperia punctata-Larven dagegen überleben nach BELL, GALVIN und TURK (196o) in Texas maximal 13o Tage. 5o% ster-

ben meist schon in den ersten 46 Tagen ab. BESCH (1964) hielt dritte Larven 15 Monate lang bei Zimmertemperaturen und erreichte damit noch offenkundige Infektionen bei Kaninchen.

Wohl am widerstandsfähigsten sind Larven von C. oncophora, so daß sie nach GOLDBERG und RUBIN (1956) sowie GOLDBERG und LUCKER (1959, 1963) in Beltsville grundsätzlich überwintern und über heiße, trockene Sommer in gleicher Weise infektionstüchtig bleiben. ROSE (1963b) stellte fest, daß die Larven praktisch unabhängig vom Klima sind, wenn sie einmal das infektiöse Stadium erreicht haben. Auf Weiden überleben sie 7-8 Monate grundsätzlich, zwei Jahre nur ausnahmsweise. Ihre Infektiosität wurde ferner nicht beeinträchtigt durch eine 22-25 Monate dauernde Aufbewahrung bei 4-11°C. Auch Temperaturen von -4 bis -6°C überlebten infektiöse Larven 24 Wochen lang. SCHWINK (1963), ANDERSON, LEVINE und MARQUARD (1964) sowie ERHARDOVA (1962) und HELLE (1963) bestätigen die sichere Überwinterung.

THRELKELD führte 1948 mit Chabertia ovina einen Freilandversuch in Virginia aus.Er schickte wurmfrei aufgezogene Lämmer auf eine Weide, die vorher von einem infizierten Schaf begrast worden war. Eine geringe Anzahl Larven überlebte eine Zeit von 2 bzw. 5 1/2 und 8 1/2 Monaten. Die letzten beiden Perioden schlossen die Wintermonate mit ein. ERHARDOVA (1962) fand ähnliche Ergebnisse; sie stellte fest, daß infektiöse Chabertia ovina-Larven auf der Weide von September bis Mai, auch bei Minimaltemperaturen von -3o°C und tiefer überleben können. Während ROSE (1965) in Südengland eine Überwinterung für wahrscheinlich hält, verneint dies KATES (195o).

Über die Lebensfähigkeit von Dictyocauluslarven finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. Nach BORCHERT und TIMM (1949) überstanden 3. Dictyocaulus filaria-Larven während fünf Wintermonaten auf ungeschützter Weide kurzfristig Temperaturen von -17°C. ROSE (1955,1956) hält Larven von D. filaria und D.viviparus speziell bei Trockenheit und hohen Temperaturen für nicht besonders

widerstandsfähig. Dagegen gelang es BORODINA (1957) im Frühjahr Mäuse mit D. filaria-Larven zu infizieren, welche trotz Temperaturen von -40°C im Kot direkt auf der Erde überwintert hatten. Auch SWIETLIKOWSKI (1959) und ERHARDOVA (1962) fanden überwinternde D. filaria- und D. viviparus-Larven in Gegenden mit sehr kaltem Klima. ALLAN und BAXTER (1957) führten Versuche auf einer natürlich infizierten Weide in Nordirland durch, die ab Ende Oktober in Intervallen auf das Vorhandensein von Lungenwurmlarven untersucht wurde. Sie stellten bis in den April hinein lebende Larven fest, bedingt sicherlich durch das dortige milde, feuchte Wetter. Auch JARETT und M. (1954) beobachteten im Westen Schottlands Rinderlungenwurmlarven, die auf der Weide ein Jahr lang auch Frosttemperaturen überlebt hatten und anschließend Kälber infizieren konnten.

ENIGK und DÜWEL (1961) fanden ähnliche Ergebnisse in Deutschland. Sie brachten ab Herbst 1956 in jedem Jahr lungenwurmhaltigen Kot auf Weiden in der Wesermarsch und im Raum Helmstedt-Hannover. In einigen Versuchen konnten sie bis Anfang Juni, in einem sogar bis Anfang Juli lebende Lungenwurmlarven feststellen. Die Ansteckungsfähigkeit dieser Larven wurde experimentell an vier Kälbern bestätigt. SPENGLER (1955) beobachtete in Freilandversuchen im schwäbischen Allgäu ebenfalls eine verhältnismäßig große Widerstandsfähigkeit. VEGORS (1963) wies in Laborversuchen nach, daß infektiöse Lungenwurmlarven die täglichen Temperaturschwankungen und plötzliche Temperaturrückgänge besser vertrugen als Entwicklungsstadien, die bei gleichbleibenden Temperaturen gehalten wurden.

Von anderen Autoren werden dagegen kürzere Überlebenszeiten angegeben. ROSE und MICHEL (1957) zeigten in ihren Experimenten, daß zwar eine große Anzahl Larven sowohl in einem heißen, trockenen Sommer als auch während des Winters vom Gras wiedergewonnen werden kann, daß diese Formen aber nicht mehr infektiös sind. Auch WETZEL (1945, 1948) verneint eine Überwinterung, ebenso SOLIMAN (1952) für Südengland. PORTER (1942) machte Versuche auf Weiden in Alabama mit wurmfrei aufgezogenen Kälbern und stellte dabei fest,

daß D. viviparus-Larven in dieser Gegend 43 Tage nicht überleben. Ähnliche Ergebnisse fand STABLEFORTH (1953) in Weybridge. VERCRUYSSE (1952) untersuchte im Dezember 1951 mit Dictyocaulus viviparus natürlich infizierte Weiden in Holland. Sie erwiesen sich im folgenden April als negativ. Während der 125 Tage des Experimentes gab es 24 Tage lang Frost und abwechselndes Frieren und Tauen in 43 Fällen. Die Temperaturen schwankten von -8°C bis +15°C. Schließlich hält GEORGIEW (1956) bei den in Bulgarien bestehenden klimatischen Verhältnissen eine Überwinterung von Lungenwurmlarven für ausgeschlossen, da die in Wasser gehaltenen Larven I-III dortige Temperaturtagesschwankungen von -2o°C bis -3°C höchstens 5 Tage lang aushielten.

Larven von großen und kleinen Pferdestrongyliden (Strongylus, Trichonema) sind außerordentlich widerstandsfähig. Nach OBER-BLÖBAUM (1932) schädigt häufigeres Auftauen und Einfrieren die Larven. Strongylus vulgaris-Larven waren nach 4 1/2 Monaten Einwirkung von -6 bis -12°C abgetötet, Trichonema-Larven überlebten zum geringen Teil 8 1/2 Monate. Nach RAFFENSBERGER (zit. ENIGK, 1934) sollen Pferdestrongylidenlarven zwei Winter und einen Sommer überleben können. RICHTERS und FRISCHBIER (193o) fanden im Kot noch nach 16 Monaten, LUCKER (1941a, 1941b) in Freiland- und Laborversuchen bei Temperaturen von 3°C bis -5°C 346 Tage lang lebende Larven. TAYLOR (1938) dagegen sah eine maximale Lebenszeit im Gras von nur 35 Wochen. RYAZANTSEV (1952) stellte im Kubishevdistrikt nach zwei Jahren und acht Monaten auf Lehmboden noch überlebende Strongylidenlarven fest; in Ställen waren sie nach zwei Jahren und zwei Monaten abgestorben. BARUS (1963) schließlich hat die exogene Entwicklung von Trichonemalarven auf der Weide untersucht. Sie dauert je nach Jahreszeit 1o-3o Tage. Eine Überwinterung ist die Regel. Die Überlebenszeit auf der Weide lag zwischen 396 und 45o Tagen.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methodik

Meine Untersuchungen führte ich an 3. Larven von Trichostrongyliden (Haemonchus, Ostertagia, Trichostrongylus, Cooperia) und Chabertia ovina , Metastrongyliden (Dictyocaulus viviparus) und Pferdestrongyliden (Strongylus vulgaris, Trichonema spp.) durch.

Die 4 Trichostrongylidenarten sowie Chabertia ovina fand ich als Mischinfektion bei 2 Versuchsschafen. Da diese Larvenarten nur sehr schwer nach längerer Lagerung voneinander zu unterscheiden sind, werden sie später bei der Schilderung der Untersuchungsergebnisse zusammen als Trichostrongyliden bewertet. Zur Gewinnung der Lungenwurmlarven hatte ich zwei 3 Monate alte Kälber mit lo ooo infektiösen Dictyocaulus viviparus-Larven infiziert. Strongylus vulgaris- und Trichonema-Material isolierte ich aus dem Kot eines mit dieser Mischinfektion behafteten Pferdes. Da aber diese beiden Arten gut zu identifizieren sind, werden sie getrennt beurteilt.

Zur Züchtung der 3. Larven brachte ich den Kot in Kulturgläser und hielt ihn 8 Tage lang mäßig feucht bei Temperaturen von 26-27°C im Brutschrank. Die Larven selbst isolierte ich mit dem allgemein bekannten Trichterverfahren nach Wetzel.

Die Beschaffung infektiöser Dictyocaulus viviparus-Larven erfolgte, indem ich die Larven I aus dem frisch entnommenen Kot lungenwurmbefallener Kälber auswandern ließ. Die Züchtung erfolgte dann in Aqua dest. bei Temperaturen um 22°C im Brutschrank, wobei die in Petrischalen befindlichen Kulturen täglich durch Einblasen von Luft mit Sauerstoff versorgt wurden.

Für die Versuche verwendete ich nur Larven, die mindestens 8 Tage alt waren. Dabei wurden o,2 ml der Larvensuspension in 2 ml Ampullen abgefüllt, gekennzeichnet, verschlossen und der entsprechenden Konservierungsmethode zugeführt.

Als Schutzmittel für die Haltung von Trichostrongyliden- und Strongyliden-Larven benutzte ich auf Grund der Literatur folgende Medien:

Aqua dest.
Aqua dest. mit Zusatz von 1o% Glyzerin
Aqua dest. " 25% "
Aqua dest. " 5o% "
Aqua dest. " 1o% DMSO (Dimethylsulfoxyd)
Aqua dest. " 25% "
Aqua dest. " 5o% "
Aqua dest. " 1o% Glyzerin+1o% Eidotter
Aqua dest. " 2o% Glyzerin+2o% Eidotter

Bei der Haltung von Dictyocaulus viviparus-Larven verwendete ich dagegen die Schutzmedien in etwas niedrigeren Konzentrationen (Aqua dest. mit Zusatz von 5%, 1o% und 25% Glyzerin bzw. von 5%, 1o% und 25% DMSO). Die Zusätze von Glyzerin+Eidotter unterblieben bei dieser Larvenart, da diese Medien auch nach starker Verdünnung relativ undurchsichtig blieben und damit die Beurteilung der Vitalität der Larven, die sonst nach ihrer Beweglichkeit und Struktur erfolgte, unmöglich wurde.

Um die Widerstandsfähigkeit der Larven unter möglichst vielen Bedingungen zu prüfen, wurden die Proben unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt. Die Haltung erfolgte bei 18-2o°C (Zimmertemperatur), bei 4°C (Kühlschranktemperatur), bei -18 bis -2o°C sowie bei -76°C.

Das Einfrieren geschah bei -18 bis -2o°C sowie bei -76°C auf 2 verschiedene Arten. Ein schnelles Einfrieren wurde erreicht, indem die Proben eine halbe Stunde lang im Kühlschrank lagerten und dann sofort in die Tiefkühltruhen gebracht wurden. Beim langsamen Einfrieren wurden die Proben zunächst in den Kühlschrank (4°C) gestellt und dort eine halbe Stunde belassen. Anschließend kamen sie in eine ebenso temperierte Tiefkühlbox, in der die Temperatur dann langsam in fünf Minuten um 4°C bis auf -2o°C abgekühlt wurde. Danach brachte ich das Material in die Tiefkühltruhen, wo es entweder bei -18 bis -2o°C oder bei -76°C unterschiedlich lange gelagert wurde.

Die lediglich in Wasser gehaltenen Proben fror ich nur schnell ein, da sich - wie viele Autoren übereinstimmend festgestellt haben - beim langsamen Einfrieren in und zwischen den einzelnen Zellen große Eiskristalle bilden, die das Gewebe zerstören. Um feststellen zu können, wie die in Wasser befindlichen Larven auf starke Temperaturschwankungen reagieren, wurde die eine Hälfte der bei -2o°C gelagerten Proben täglich für kurze Zeit aufgetaut und wieder eingefroren.

Nach Ablauf der jeweiligen Versuchszeit erfolgte in jedem Falle, also auch bei dem Material, das bei Zimmertemperatur und Kühlschranktemperatur gelagert wurde, ein Auftauen bzw. Erwärmen im Wasserbad von +37°C für 5 Minuten. Die Proben wurden dann geöffnet und das Schutzmedium soweit wie möglich abgesogen. Der verbleibende Bodensatz, der die Larven enthielt, wurde durch Hinzufügen von Aqua dest. verdünnt. Nach 24 Stunden untersuchte ich die Präparate unter dem Mikroskop auf überlebende Larven.

In einer zweiten Versuchsreihe sollte die Widerstandsfähigkeit der 3. Larven gegenüber variablen Temperaturen festgestellt werden. Dazu wurde eine bestimmte Menge Kot, die eine bekannte Anzahl Larven enthielt, in Petrischalen gefüllt und Temperaturen von 18-2o°C (Zimmertemperatur), 4°C (Kühlschranktemperatur) sowie -2o°C ausgesetzt. Das Einfrieren auf -2o°C erfolgte schnell, indem die Petrischalen nach einer halben Stunde im Kühlschrank (+4°C) direkt in die Tiefkühltruhe gelegt wurden. Die eine Hälfte des Materials blieb dort bis zum Zeitpunkt des Auftauens, die andere wurde täglich eine Stunde lang im Brutschrank bei +37°C aufgetaut und dann wieder eingefroren. Im Abstand von vier bis sechs Wochen untersuchte ich die Proben auf überlebende Larven. Hierzu wurden die Kulturen, wie oben schon beschrieben, wieder eine Stunde lang im Brutschrank bei +37°C aufgetaut bzw. erwärmt. Die im Kot überlebenden Larven isolierte ich mit Hilfe des Auswanderverfahrens und zählte sie unter dem Mikroskop aus.

Von Anfang November 1965 bis Ende April 1966 führte ich auch Überwinterungsversuche mit 3. Stadien derselben Larvenarten durch. Dabei wurde der eine bestimmte Menge Larven enthaltende Kot nicht direkt mit dem Boden in Berührung gebracht, sondern ich benutzte als Unterlage 15 cm lange, 11 cm breite und 4,5 cm hohe Blechbehälter, die mit Grasboden gefüllt und eine Stunde lang bei + 80°C im Brutschrank sterilisiert worden waren. Durch dieses Verfahren sollte die Besiedelung mit Erdnematoden verhindert werden, was, wie ich später feststellen konnte, auch weitgehend der Fall war. Im Abstand von 4 bis 6 Wochen wurden die Proben auf überlebende Larven untersucht. Dabei isolierte ich diese aus dem Kot mit dem Auswanderverfahren. Auch aus dem umliegenden Gras reicherte ich eventuell ausgewanderte Larven an.

B. Ergebnisse

Das primäre Ziel dieser Arbeit sollte die Möglichkeit einer Gefrierkonservierung von Helminthenlarven sein, um für gezielte Labor- und Feldversuche stets auf genügend Infektionsmaterial zurückgreifen zu können. Erst an zweiter Stelle wollten wir zu einigen noch offenen Fragen der Überwinterungsmöglichkeit verschiedener Wurmlarven Stellung nehmen und dazu entsprechende Laborversuche durchführen. Deshalb werden auch die erzielten Ergebnisse in zwei gesonderten Abschnitten geschildert.

1. Möglichkeit der Gefrierkonservierung von Infektionslarven parasitischer Nematoden

Die Überlebensdauer der für die Versuche verwendeten Helminthenlarven war abhängig vom Schutzmedium und dessen Konzentration sowie vor allem von den unterschiedlichen Temperaturen. Die erzielten Ergebnisse werden deshalb auf die einzelnen Temperaturbezirke bezogen.

Bei einer Haltungstemperatur von 18-2o°C und in 1o%igem DMSO überlebten noch 37% der eingebrachten Trichostrongylidenlarven nach 1oo Tagen. Dagegen waren sie in 5o%igem DMSO nach 5 Tagen abgetötet. Bei Verwendung von Glyzerin enthaltenden Medien war der Unterschied geringer. Die Larven überlebten im allgemeinen 2o Tage, bei Zusatz von 1o% Glyzerin+1o% Eidotter 5o Tage (Tabelle 1).

Infektiöse Dictyocaulus viviparus-Larven waren über 5o Tage in 5 und 1o%igem DMSO lebensfähig. Dagegen vertrugen sie die glyzerinhaltigen Schutzmedien wesentlich schlechter. In 5%igem Glyzerin konnte ich sie genau wie in 25%igem DMSO höchstens 2o Tage am Leben erhalten. Konservierungsmittel, die Zusätze von 1o%- und 25%igem Glyzerin enthielten, töteten die Larven schon in 2o bzw. 1o Tagen ab.

Am widerstandsfähigsten erwiesen sich bei Temperaturen von 18-2o°C die 3. Larven der Pferdestrongyliden. Sie überlebten mindestens 2o, im allgemeinen aber 5o Tage. Lediglich in 5o%igem DMSO waren sowohl Trichonema- als auch Strongylus vulgaris-Larven nach 5 Tagen abgetötet. Trichonema ließ sich in 1o%igem Glyzerin, in 1o% Glyzerin+1o% Eidotterzusatz, in 2o% Glyzerin+2o% Eidotterzusatz sowie in 1o%igem DMSO sogar über 1oo Tage am Leben erhalten (Tabelle 1). Allerdings waren schon während dieser Zeit geringe Degenerationserscheinungen wahrnehmbar.

Interessanterweise blieben die in Aqua dest. gehaltenen Larven am längsten (mindestens 12o Tage) lebensfähig, obgleich auch hier nach 6o-8o Tagen die ersten strukturellen Veränderungen auftraten. Die größte Widerstandsfähigkeit zeigten die Strongylus vulgaris-Larven, von denen nach 25o Tagen noch 8o% am Leben waren (Tabelle 2). Dagegen begannen Trichonema-Larven schon nach 4o tägiger Aufbewahrung leicht zu schrumpfen. Nach 8o Tagen hatten alle lediglich noch die Hälfte ihrer ursprünglichen Körperlänge, ohne dabei ihre Beweglichkeit zu verlieren.

Larven von	Trichostrongyliden					Strongylus vulg.					Trichonema spp.					Dictyocaulus vivip.				
Tage	5	10	20	50	100	5	10	20	50	100	5	10	20	50	100	1	5	10	20	50
5% Glyzerin																98	62	33	11	-
10% Glyzerin	81	77	38	-	-	95	92	89	82	65	81	74	64	25	-	82	57	22	-	-
25% Glyzerin	56	27	7	-	-	81	55	35	15	-	70	54	35	-	-	53	26	-	-	-
50% Glyzerin	44	28	12	-	-	49	24	7	-	-	57	35	22	-	-					
10% Glyzerin +10% Eidotter	79	68	50	17	-	87	85	80	63	48	81	77	65	35	-					
20% Glyzerin +20% Eidotter	81	75	38	-	-	82	70	69	67	42	89	80	72	34	-					
5 % DMSO																95	91	90	78	31
10 % DMSO	88	80	72	66	37	92	89	90	62	35	90	86	84	63	27	94	92	82	76	10
25 % DMSO	27	10	-	-	-	74	33	8	-	-	72	51	34	-	-	93	64	35	18	-
50 % DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 1: Menge der überlebenden, in verschiedenen Medien bei 18-20°C gehaltenen 3. Larven (in %)

Tage	1o	25	5o	1oo	12o	15o	2oo	25o	3oo
Trichostrongyliden	97	94	9o	72	72	7o	61	44	
Dictyocaulus vivip.	93	77	45	13	7	-	-	-	-
Strongylus vulgaris	98	97	93	9o	9o	88	85	8o	
Trichonema spp.	97	9o	7o	45	3o	-	-	-	-

Tabelle 2: Menge der überlebenden bei 18-2o°C in Aqua dest. gehaltenen 3. Larven (in %)

Die Temperatur von 4°C erwies sich für die Haltung der Larven sehr günstig. Im Kühlschrank überlebten infektiöse Trichostrongylidenlarven in 1o und 25%igem Glyzerin, in 1o% Glyzerin+1o% Eidotterzusatz, in 2o% Glyzerin+2o% Eidotterzusatz sowie in 1o%igem DMSO über 1oo Tage (längster untersuchter Zeitraum). Allerdings waren in 5o%igem DMSO auch bei dieser Temperatur schon nach fünf Tagen alle Larven abgetötet.

Dagegen vertrugen die Dictyocaulus viviparus-Larven die angewandten Schutzmedien sehr gut und blieben in allen Lösungen in unterschiedlicher Menge länger als 5o Tage (längster untersuchter Zeitraum) am Leben.

Ähnliche Ergebnisse wurden für die Pferdestrongylidenlarven ermittelt, die den Untersuchungszeitraum von 1oo Tagen in allen Medien überstanden. Eine Ausnahme machte auch hier das 5o%ige DMSO, in dem innerhalb von fünf Tagen alle Larven sterben (Tabelle 3).

Auch bei diesem Versuch überlebten die in Aqua dest. (Kontrollen) gehaltenen Larven am längsten (Tabelle 4). Nach 25o Tagen waren noch 7o% der Trichostrongyliden- und 88% der Pferdestrongyliden-Larven gut beweglich. Lediglich die Trichonemalarven zeigten teilweise starke Schrumpfungen. Nach 2oo-tägiger Aufbewahrung hatten nur

Larven von	Trichostrongyliden					Strongylus vulg.					Trichonema spp.					Dictyocaulus vivip.				
Tage	5	10	20	50	100	5	10	20	50	100	5	10	20	50	100	1	5	10	20	50
5% Glyzerin																97	90	77	71	33
10% Glyzerin	90	82	70	65	49	94	92	90	84	83	85	83	81	80	77	93	75	68	58	29
25% Glyzerin	68	61	37	30	12	81	62	46	29	24	71	66	70	56	51	73	60	49	40	7
50% Glyzerin	60	57	46	27	-	55	43	36	25	17	74	49	43	40	38					
10% Glyzerin +10% Eidotter	80	78	70	49	40	95	93	90	88	85	87	82	78	74	71					
20% Glyzerin +20% Eidotter	81	76	62	36	20	94	90	90	79	69	92	81	80	64	52					
5% DMSO																96	93	94	93	83
10% DMSO	90	86	84	81	62	96	94	90	89	90	91	90	91	90	88	90	89	87	80	72
25% DMSO	67	33	14	-	-	79	76	75	62	22	81	76	73	62	21	91	85	83	75	6
50% DMSO	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 3: Menge der überlebenden, in verschiedenen Medien bei 4°C gehaltenen 3. Larven (in %)

noch 15% der Dictyocaulus viviparus-Larven ihr normales Aussehen und waren aufgerollt. Ihre Infektiosität wurde bei zwei 3 Monate alten Kälbern bestätigt. Beide Tiere schieden 23 Tage nach der Infektion Lungenwurm-Larven aus.

Tage	1o	25	5o	1oo	12o	15o	2oo	25o	3oo
Trichostrongyliden	96	95	9o	83	8o	76	74	7o	
Dictyocaulus vivip.	94	77	55	24	2o	17	15	-	-
Strongylus vulgaris	98	96	97	95	94	91	9o	88	
Trichonema spp.	99	97	97	96	97	94	9o	88	

Tabelle 4: Menge der überlebenden bei 4°C in Aqua dest. gehaltenen 3. Larven (in %)

Beim schnellen Einfrieren auf -2o°C erzielte ich bei meinen Gefrierversuchen die besten Ergebnisse (Tabelle 5). Infektiöse Trichostrongylidenlarven überlebten bei dieser Temperatur in 5o%igem Glyzerin 5o Tage. Nach 1oo Tagen waren sie in allen Medien zerstört. Dictyocaulus viviparus-Larven III blieben in 5%igem Glyzerin sowie 5%igem DMSO 2o Tage lang lebensfähig. Strongylus vulgaris überlebte in allen Medien, mit Ausnahme von 25%- und 5o%igem Glyzerin, Trichonema-Larven grundsätzlich länger als 1oo Tage (längster untersuchter Zeitraum).

Beim langsamen Einfrieren auf -2o°C reagierten die einzelnen Larvenarten in den verschiedenen Medien sehr unterschiedlich. Die Trichostrongyliden-Larven wiesen schon nach 5 Tagen Luftblasen in ihrem Innern und zerstörte Darmzellen auf. Lediglich in 1o%igem DMSO lebten nach 2o Tagen noch 1o%, in 25%igem DMSO nach 5o Tagen noch 6% (Tabelle 6).

Für die Dictyocaulus viviparus-, die Strongylus vulgaris- und Trichonema-Larven erhielt ich ähnliche Ergebnisse wie beim schnellen Einfrieren. Die Lungenwurmlarven überdauerten in 5%igem Glyzerin 2o Tage, in 1o%- und 25%igem

Glyzerin sowie in 5%- und 10%igen DMSO 10 Tage.

Die Versuche, bei -76°C eine längere Lebensfähigkeit der Trichostrongyliden- und Dictyocaulus-Larven zu erreichen, schlugen fehl. Sowohl beim schnellen wie beim langsamen Einfrieren zeigte das Helminthenmaterial schon nach fünf Tagen Degenerationserscheinungen und war völlig unbeweglich. Dagegen vertrugen die großen und kleinen Pferdestrongyliden diese Temperatur im allgemeinen gut. Auch die Art des Einfrierens spielte keine Rolle. In allen Medien betrug die Überlebensrate für Trichonema-Larven nach 100 Tagen mehr als 50%, in 50%igem DMSO sogar 80%. Die glyzerinhaltigen Medien wurden von den Str. vulgaris-Larven schlechter vertragen. Sie überlebten in kleiner Menge höchstens 20 Tage, dagegen in 50%igem DMSO zu 80% länger als 100 Tage.

Die Überlebensrate der in Aqua dest. eingefrorenen Kontrollen hing von der Larvenart, der Temperatur und Aufbewahrungsart ab. Trichostrongylidenlarven vertrugen starke Temperaturschwankungen, wie sie beim täglichen Auftauen bei +37°C und Wiedereinfrieren auf -20°C auftraten, gut. Sie blieben länger (15 Tage) am Leben als in ununterbrochen eingefrorenen Proben (3 Tage). Dictyocaulus viviparus-Larven wurden durch starke Temperaturschwankungen kaum beeinflußt. Sie vertrugen Temperaturen von -20°C höchstens drei Tage, -76°C überhaupt nicht (Tabelle 7). Auch die Strongylus vulgaris-Larven wurden durch öfteres Auftauen und Wiedereinfrieren wenig beeinflußt. Nach 20 Tagen lebten noch 23%, von den eingefroren gebliebenen noch 15%. Temperaturen von -76°C vertrugen sie höchstens 8 Tage. Widerstandsfähiger waren dagegen Trichonema-Stadien. Lediglich Temperaturschwankungen vertrugen jene so schlecht wie die Lungenwürmer.

Larven von	Trichostrongyliden					Strongylus vulg.					Trichonema spp.					Dictyocaulus vivip.				
Tage	5	10	20	50	100	5	10	20	50	100	5	10	20	50	100	1	3	10	20	50
5% Glyzerin																83	52	20	8	
10% Glyzerin	31	22	18	-	-	72	65	61	43	25	81	80	77	69	65	70	45	18	-	-
25% Glyzerin	30	18	11	-	-	66	44	21	-	-	72	65	53	35	33	57	41	24	-	-
50% Glyzerin	80	59	39	12	-	73	59	26	-	-	73	71	65	59	55					
10% Glyzerin +10% Eidotter	42	38	25	-	-	82	75	70	58	25	80	79	76	71	69					
20% Glyzerin +20% Eidotter	58	44	28	-	-	85	75	62	57	16	80	77	65	59	50					
5 % DMSO																78	54	39	10	-
10 % DMSO	21	12	9	-	-	79	70	56	37	6	85	79	68	40	18	85	53	21	-	-
25 % DMSO	22	-	-	-	-	85	61	57	55	50	78	72	67	65	63	68	42	25	-	-
50 % DMSO	-	-	-	-	-	81	80	75	60	58	72	71	69	55	44					

Tabelle 5: Menge der überlebenden, in verschiedenen Medien schnell auf -20°C eingefrorenen 3.Larven (in %)

Larven von	Trichostrongyliden					Strongylus vulg.					Trichonema spp.					Dictyocaulus vivip.				
Tage	5	10	20	50	100	5	10	20	50	100	5	10	20	50	100	1	5	10	20	50
5 % Glyzerin																76	50	23	12	-
10% Glyzerin	-	-	-	-	-	70	54	50	42	19	78	75	73	65	62	60	51	21	-	-
25% Glyzerin	-	-	-	-	-	61	37	17	-	-	70	64	51	36	29	65	45	20	-	-
50% Glyzerin	-	-	-	-	-	69	53	16	-	-	71	68	61	56	55					
10% Glyzerin +10% Eidotter	-	-	-	-	-	79	70	58	45	21	75	73	70	64	60					
20% Glyzerin +20% Eidotter	-	-	-	-	-	80	69	54	42	12	77	69	61	55	47					
5 % DMSO																61	33	18	-	-
10% DMSO	14	11	10	-	-	76	68	52	33	6	80	76	64	37	13	32	17	12	-	-
25 % DMSO	19	16	9	6	-	85	59	50	46	39	74	70	67	59	17	43	23	-	-	-
50 % DMSO	-	-	-	-	-	80	75	71	62	55	68	66	62	48	45					

Tabelle 6: Menge der überlebenden, in verschiedenen Medien langsam auf -20°C eingefrorenen 3.Larven (in %)

Temperatur	-2o°C ohne Auft.						-2o°C tägl.aufget.						- 76°C					
Tage	1	3	6	1o	2o	4o	1	3	6	1o	2o	4o	1	3	6	1o	2o	4
Trichostrongyliden	69	15	-	-	-	-	69	34	1o	4	-	-	8	6	-	-	-	
Dictyocaulus vivip.	34	15	-	-	-	-	34	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Strongylus vulgaris	84	65	55	4o	15	-	84	8o	72	53	23	-	11	8	6	-	-	
Trichonema spp.	9o	81	76	66	42	29	9o	7	-	-	-	-	24	13	1o	7	4	

Tabelle 7: Menge der überlebenden, in Aqua dest. auf verschiedene Art bei verschiedenen Temperaturen gehaltenen 3. Larven (in %)

2. Lebensdauer der Larven im Kot bei verschiedenen Temperaturen

Nachdem die beabsichtigte Gefrierkonservierung infektionstüchtiger Nematodenlarven für längere Zeit sich nicht verwirklichen ließ, sollten vergleichende Untersuchungen Aufschluß geben über die Lebensdauer derselben Helminthenstadien, wenn sie im Kot den verschiedenen Temperaturen ausgesetzt werden.

Bei einer Aufbewahrungstemperatur von 18-2o°C blieben mit Ausnahme von Dictyocaulus alle Wurmlarven mindestens 2o Wochen am Leben (Tabelle 8). Lediglich die Lungenwurmlarven hatten anscheinend bei dieser relativ hohen Temperatur ihre Reservestoffe sehr bald verbraucht.

Besonders günstig wirkten auf die Lebensdauer der im Kot verwahrten Helminthen-Entwicklungsstadien Kühlschranktemperaturen von 4°C. Während Lungenwürmer lediglich 4 Wochen und dies nur zu einem sehr geringen Prozentsatz überlebten, konnte zumindest ein Teil aller anderen Larven noch 16-2o Wochen später lebend zurückgewonnen werden (Tabelle 8).

Temperatur	18-2o°C								4°C							
Wochen	4	6	8	12	16	18	2o	24	4	6	8	12	16	18	2o	24
Trichostrongyliden	13		1o	6	3		2	1	57		3o	23	1o		6	2
Dictyocaulus vivip.	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-
Strongylus vulgaris		97		77		56		23		98		76		53		23
Trichonema spp.		48		18		13		6		53		37		29		11

Tabelle 8: Menge der überlebenden, im Kot bei 18-2o°C und bei 4°C gehaltenen 3. Larven (in %)

Überraschenderweise war bei -2o°C die Überlebensfähigkeit der Larven im allgemeinen schlecht. 1o Tage lang ununterbrochen eingefrorene Trichostrongylidenlarven waren ebenso restlos abgetötet wie diejenigen, die täglich eine Stunde lang aufgetaut wurden (Tabelle 9). Noch empfindlicher erwiesen sich die Dictyocaulus-Larven, die nach 6 Tagen alle abstarben. Lediglich die Pferdestrongylidenlarven überlebten in größerer Zahl (23-3o%) über 30 Tage.

Temperatur	-2o°C ohne Auftauen							-2o°C tägl. aufgetaut						
Tage	1	3	6	10	30	50	100	1	3	6	10	30	50	100
Trichostrongyliden	10	3	2	-	-	-	-	10	3	2	1	-	-	-
Dictyocaulus vivip.	6	2	-	-	-	-	-	6	1	-	-	-	-	-
Strongylus vulgaris	73	5?	51	37	20	2	-	75	60	53	34	23	2	-
Trichonema spp.	82	67	60	54	50	43	31	80	65	57	54	30	6	-

Tabelle 9: Menge der überlebenden, im Kot auf verschiedene Art bei -2o°C gehaltenen 3. Larven (in %)

Meine Freilanduntersuchungen führte ich auf einer kleinen Grünfläche durch, um die Einwirkung der vom 1.11.1965 bis 31.4.1966 herrschenden Außentemperaturen zu studieren. Die Tagesmaximaltemperaturen (Abb.1), die Minimaltemperaturen (Abb.2) sowie die Niederschlagsmenge (Abb.3) eines Monats entnahm ich den Angaben des Meteorologischen Institutes unserer Universität.

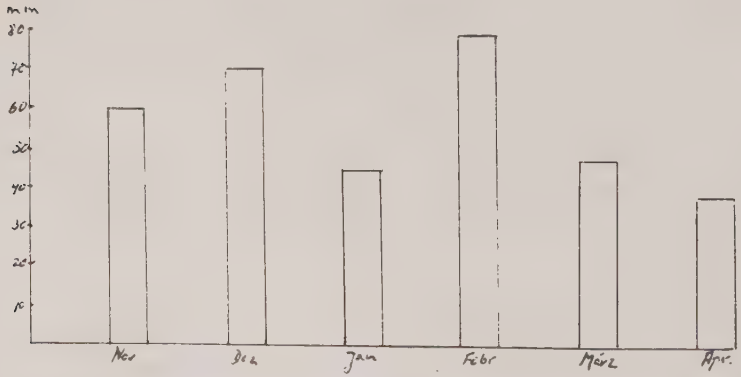

Abb. 3: Niederschlagsmengen in den Versuchsmonaten (Nach Angaben des Meteorologischen Institutes der FU Berlin)

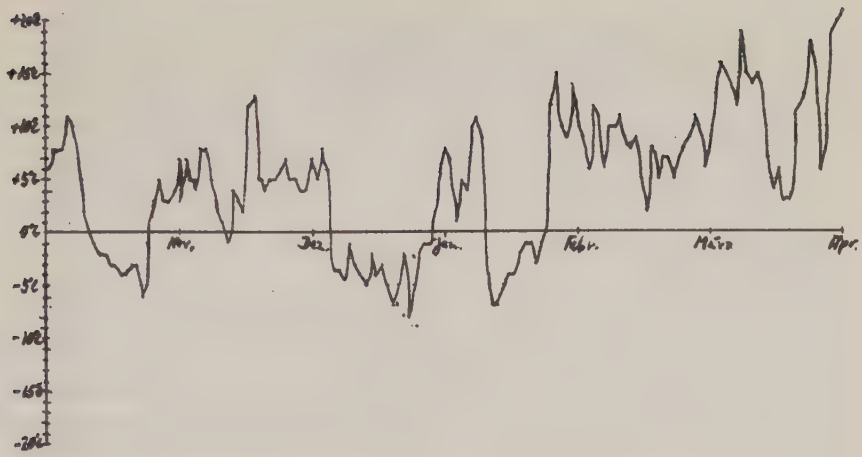

Abb.1: Maximaltemperaturen in den Versuchsmonaten
(Nach Angaben des Meteorologischen Institutes
der FU Berlin)

Abb.2: Minimaltemperaturen in den Versuchsmonaten
(Nach Angaben des Meteorologischen Institutes
der FU Berlin)

Der Winter 1965/66 begann früh und war relativ kalt. Die erste Kältewelle, bei der Temperaturen bis -15°C auftraten, lag im November. Sie ging mit starkem Schneefall einher, die Schneehöhe betrug 25 cm. Der Dezember war etwas wärmer. Dagegen lagen die Temperaturen im Januar und in der ersten Hälfte des Februar wieder einige Grade unter dem Gefrierpunkt. Auch diese zweite Kältewelle wurde von Schneehöhen bis zu 2o cm begleitet.

Am 12. November 1965 setzte ich einen Versuch mit infektiösen Trichostrongylidenlarven an, der am 1.Mai 1966 endete. Die Proben standen während dieser Zeit ungeschützt im Freien und wurden im Abstand von 4 Wochen auf überlebende Larven untersucht. Ein kleiner Prozentsatz der Larven hatte im Kot überwintert (Tabelle 1o). Allerdings wiesen viele der noch beweglichen Larven große Vakuolen auf, sie waren vielleicht nicht mehr infektionsfähig.

Am 23. Dezember 1965 brachte ich Kälberkot mit dritten Dictyocaulus viviparus-Larven auf die Grünfläche. Die Untersuchung dieses Kotes sowie dessen Umgebung auf lebende Lungenwurmlarven verlief negativ. Um dieses an sich unerwartete Ergebnis nachzuprüfen, wiederholte ich den Versuch am 25. Januar 1966 und konnte nach 4 und 8 Wochen strukturell normale, lebende Stadien nachweisen (Tabelle 1o). In einem daraufhin angesetzten Laborversuch wurden in Wasser gehaltene Dictyocaulus viviparus-Larven in einer Klimakammer ähnlichen täglichen Temperaturen ausgesetzt, wie sie zwischen dem 6. und 2o. Februar 1966 herrschten. Obgleich während dieser Zeit die Temperaturen 12 Tage lang unter dem Gefrierpunkt lagen und einen Tiefstwert von -14°C erreichten, waren nach Ablauf der Versuchszeit noch 11% der Larven aktiv aufgerollt und beweglich. Anschließend stellte ich dieses Material in einen Kühlschrank (4°C). Bei der 4 Wochen später durchgeführten Kontrolle wiesen noch knapp 5% der Larven eine normale Struktur auf und zeigten schwache Bewegung.

Am widerstandsfähigsten erwiesen sich auch hier die am 5.11.1965 angesetzten Pferdestrongylidenlarven. Ein be-

achtlicher Prozentsatz überlebte den Winter. Am 17.April 1966, als diese Versuche abgeschlossen wurden, konnte ich noch 1o% gut bewegliche Strongylus vulgaris und 6% Trichonema species-Larven nachweisen, die strukturell kaum verändert waren.

Wochen	4	6	8	12	16	18	2o	24
Trichostrongyliden	11		6	4	3		2	1
Dictyocaulus vivip.	9		3	-	-		-	-
Strongylus vulgaris		5o		33		23		1o
Trichonema spp.		51		28		1o		6

Tabelle 1o: Menge der überlebenden, im Kot bei Außentemperaturen gehaltenen 3. Larven (in %)

IV. Besprechung der Ergebnisse

Da bei Spermien und verschiedenen Protozoen eine Lebendkonservierung mit tiefen Temperaturen schon seit längerer Zeit mit Erfolg durchgeführt wird, lag der Gedanke nahe, dies auch mit infektiösen Wurmlarven zu versuchen. Dabei sollte eine möglichst lange Überlebensdauer dieser präparasitischen Stadien erreicht werden, um die mit Kosten und Zeitverlust verbundenen Tierpassagen zur Gewinnung von Versuchsmaterial zu reduzieren.

Die Widerstandsfähigkeit und Überlebensdauer der infektiösen Larven war in meinen Versuchen sehr unterschiedlich und hing zum größten Teil von der untersuchten Larvenart selber ab. Einen nicht geringen Einfluß hatten die Temperatur und die Aufbewahrungsart. Auch das Alter der Larven soll nach ENIGK (1934) eine Rolle spielen, da junge bescheidete Larven empfindlicher seien als ältere. Ich konnte diese Feststellung bei meinen Experimenten nicht machen.

In den Konservierungsversuchen waren darüber hinaus die angewandten Schutzmedien von Bedeutung. Bei Temperaturen von 18-2o°C wirkten sich die glyzerinhaltigen Medien auf fast alle Larvenarten ungünstig aus und töteten sie frühestens nach 5, spätestens nach 5o Tagen ab. Nur die Strongylus vulgaris-Larven überlebten in 1o%igem Glyzerin, in 1o% Glyzerin+1o% Eidotterzusatz sowie in 2o% Glyzerin+ 2o% Eidotterzusatz den Untersuchungszeitraum von 1oo Tagen. In 25%- und 5o%iger Konzentration wirkten auch die dimethylsulfoxydhaltigen Medien sehr toxisch. Sie zerstörten die Larven in 5 bis 2o Tagen. Auffallend war, daß die sonst recht empfindlichen Dictyocaulus viviparus-Larven in 25%igem DMSO 2o Tage überdauerten.

Gute Ergebnisse erzielte ich bei Aufbewahrungstemperaturen von 4°C. Im Kühlschrank überlebten in den glyzerinhaltigen Medien sowie in 5%-, 1o%- und 25%igem DMSO alle Larvenarten bis zum Abschluß der Versuchsreihen. Lediglich die Trichostrongyliden-Larven blieben in 5o%igem Glyzerin sowie in 25%igem DMSO höchstens 5o bzw. nur 2o Tage am Le-

ben. Dagegen fiel auch hier auf, daß die Dictyocaulus viviparus-Larven die DMSO-haltigen Medien gut vertrugen. 83% der Larven überlebten in 5%igem DMSO 5o Tage lang. 5o%iges DMSO war stark gewebeschädlich. Nur von den sehr widerstandsfähigen Strongylus vulgaris-Larven bewegten sich trotz zerstörter Darmzellen noch 11% nach 5 Tagen Einwirkung.

Das Einfrieren der Larven auf -2o und -76°C erfolgte einmal schnell und einmal langsam. Bei der Konservierung von Zellen in Glyzerin und Dimethylsulfoxyd hatten DOUGHERTY (1962), NAGINGTON und GREAVES (1962), PORTER-FIELD und ASHWOOD-SMITH (1962) sowie PERSIDSKY und RICHARDS (1963) die besten Erfolge, wenn sie das Versuchsmaterial langsam abkühlten und eine möglichst tiefe Aufbewahrungstemperatur wählten. Das gleiche wird von WEINMAN und MC ALLISTER (1947), MC ENTEGART (1954), REUSSE (1956), POLGE und SOLTYS (1957), MÜHLPFORDT (196o), BEMRICK (1961), WALKER und ASHWOOD-SMITH (1961) sowie ROBL (1965) für die Tiefgefrieraufbewahrung von Protozoen berichtet.

In meinen Versuchen konnte ich, genau wie KITE und DOEBBLER (1962) bei der Konservierung von Gewebezellen, diesen Unterschied nicht erkennen. Die bei -2o°C schnell eingefrorenen Trichostrongyliden-Larven überlebten, ausgenommen in 25%-und 5o%igem DMSO in allen Medien höchstens 2o Tage. In den erstgenannten Schutzlösungen hielten sie sich nur 2 bis 5 Tage. In allen glyzerinhaltigen Medien und in 5o%igem DMSO blieben sie bei langsamer Temperatursenkung nur wenige Tage lebensfähig.

Bei -2o°C schnell und langsam eingefrorene Dictyocaulus viviparus-Larven überlebten in 1o%- und 25%igem Glyzerin sowie in 1o%igem DMSO 1o Tage, in 5%igem Glyzerin 2o Tage. Dabei war in den glyzerinhaltigen Medien der Prozentsatz der überlebenden Larven beim langsamen Einfrieren etwas größer. Eigenartiger Weise vertrugen sie die DMSO-haltigen Schutzlösungen beim schnellen Einfrieren besser.

Wesentlich länger ließen sich bei -2o°C Pferdestrongylidenlarven aufbewahren, wobei die Einfriertechnik keinen Einfluß hatte. In den Medien mit niedrigen Glyzerinkonzentrationen überlebten 25% der Larven loo Tage, in 25% und 5o%igem Glyzerin nur 2o Tage. Hervorragend bewährte sich das Dimethylsulfoxyd. Ein Zusatz von 5o%, der bei Zimmer- und Kühlschranktemperatur die Larven in kürzester Zeit abtötete, hielt 63% des Larvenmaterials loo Tage lang infektionstüchtig.

Während die bei -76°C schnell und langsam eingefrorenen Trichostrongylidenlarven ebenso lange überlebten wie bei -2o°C, zeigten schnell und langsam eingefrorene Dictyocaulus viviparus-Larven in allen Medien schon nach 24 Stunden keine Bewegung mehr. Pferdestrongylidenlarven vertrugen diese tiefe Temperatur im allgemeinen gut und waren durch die hochprozentigen dimethylsulfoxydhaltigen Medien gegen die beim Gefrieren auftretenden Kälteschäden geschützt. Trichonema-Larven blieben im Gegensatz zu den Strongylus vulgaris-Larven, die in 25%- und 5o%igem Glyzerin nur einige Tage überlebten, auch in den glyzerinhaltigen Medien länger als loo Tage beweglich.

Temperaturschwankungen (tgl. Einfrieren und Auftauen) begünstigen für Trichostrongyliden-Larven die Lebensdauer. Dagegen war kein verlängernder Effekt bei Lungenwürmern und Strongylus-Larven festzustellen. Trichonema-Larven zeigten sich in den ununterbrochen bei -2o°C eingefrorenen Proben am widerstandsfähigsten.

Meine erzielten Ergebnisse zeigen, daß beim Einfrieren auf -2o und -76°C Zusätze von Schutzlösungen die Überlebensdauer infektiöser Larven verschiedener Wurmarten zwar verlängern können, daß aber eine lohnende Lebendkonservierung nicht möglich ist.

Ohne Schutzmedien gehaltene Cooperia-Larven behielten nach BESCH (1964) ihre Infektiosität über 15 Monate, wenn sie auf angefeuchtetem Fließpapier bei Temperaturen von 6-8°C aufbewahrt wurden. Auf die gleiche Art konnte HERLICH (1966) infektiöse Trichostrongylus colubriformis-Larven 12 Monate lang bei 4°C halten. Mein Infektions-

material in Petrischalen mit Aqua dest. bei 4°C (Kühlschranktemperatur) überlebte 25o (Trichostrongyliden- bzw. Strongyliden-Larven) bzw. 2oo Tage (Dictyocaulus-Larven).

Temperaturen von 18-2o°C (Zimmertemperatur) waren in jedem Falle ungünstiger. Besonders die Larven von Trichonema spp.zeigten starke Degenerationserscheinungen und überdauerten nicht einmal 15o Tage.

In den Versuchen über die Widerstandsfähigkeit der verschiedenen Larvenarten im Kot erzielte ich im Prinzip ähnliche Ergebnisse wie für die in Aqua dest. gehaltenen Larven. Die günstigste Aufbewahrungstemperatur lag bei 4°C, am widerstandsfähigsten waren die Pferdestrongyliden-Larven. Doch fiel auf, daß im Vergleich zu dem in Wasser gehaltenen Versuchsmaterial die Anzahl der bei Temperaturen von 18-2o°C und bei 4°C aus dem Kot auswandernden Larven klein war. Auch die Überlebensdauer war geringer als in Wasser. Dieses Ergebnis ist eventuell damit zu erklären, daß eine starke Beeinträchtigung der Beweglichkeit der Larven im Kot diese nicht mehr auswandern ließ.

Von den bei Zimmertemperaturen im Kot aufbewahrten Trichostrongylidenlarven lebten nach 14o Tagen nur noch 2%, im Kühlschrank noch 6%. Aus den bei 18-2o°C gehaltenen Dictyocaulus viviparus-Proben wanderten nach 28 Tagen keine lebenden Larven mehr aus. Dies entspricht den in der Literatur vorliegenden Ergebnissen von PORTER (1942), STABLEFORTH (1953), ROSE (1956) sowie ROSE und MICHEL (1957). Die bei -2o°C eingefrorenen Larven erhielten durch den sie umgebenden Kot einen, wenn auch geringen Schutz gegen Kälteschäden und überlebten im allgemeinen etwas länger als bei gleicher Temperatur in Wasser.

In den Freilandversuchen, die von November 1965 bis April 1966 liefen, sollte die Überwinterungsfähigkeit von infektiösen Trichostrongyliden-, Dictyocaulus viviparus-, Strongylus vulgaris- und Trichonema spp.-Larven untersucht werden. Von zahlreichen Autoren war nämlich in den letzten Jahren berichtet worden, daß verschiedene Schafnematoden

imstande sind unter zum Teil sehr ungünstigen Bedingungen zu überwintern. So stellte KATES (1950) bei Versuchen in Beltsville fest, daß Ostertagia- und Nematodirus-Larven äußerst widerstandsfähig sind und den Winter in dieser Gegend gut überleben können. Haemonchus, Cooperia, Trichostrongylus und Chabertia ovina überwinterten dort nicht. Dies bestätigt auch ERHARDOVA (1962) für die Tschechoslowakei und HELLE (1963) für die Gegend von Oslo. In meinen Versuchen waren von den Trichostrongylidenarten nur die infektiösen Ostertagia-Larven imstande, den Winter 1965/66 im Raum Berlin zu überleben.

In den letzten Jahren sind ferner unterschiedliche Meinungen über die Dauerhaftigkeit von Lungenwurmlarven auf der Weide geäußert worden. WETZEL (1948), SOLIMAN (1952) und VERCRUYSSE (1952) konnten bei Freilandversuchen unter natürlichen Bedingungen keine überwinternden Dictyocaulus viviparus-Larven feststellen, obgleich sie ihre Untersuchungen in Gegenden durchführten, in denen sehr tiefe Temperaturen selten sind. Andere Autoren dagegen berichten, daß in Kotballen und in langem, dichten Gras die Larven extreme Gefriertemperaturen überstehen. So stellte SWIETLIKOWSKI (1959) auf Weiden im nordöstlichen Teil Polens eine Überwinterung von Rinderlungenwurmlarven fest. ERHARDOVA (1962) bestätigte dies für die Tschechoslowakei. In meinen Experimenten überlebten Dictyocaulus-Larven im Winter 1965/66 im allgemeinen höchstens 8 Wochen, in einem Versuch mit einer mehrwöchigen Kälteperiode und Temperaturen bis -15°C weniger als 28 Tage, obgleich die Larvenkulturen durch eine 20 cm hohe Schneedecke geschützt waren. In ähnlicher Weise konnten STABLEFORTH (1953) sowie MICHEL und ROSE (1954) zu keiner Zeit länger als 3 Monate überlebende Larven feststellen.

In Anlehnung an die Berichte von VEGORS (1963) setzte ich unter Nachahmung der zwischen dem 6. und 20. Februar 1966 herrschenden Temperaturen einen Laborversuch an. Dabei überstanden Dictyocaulus viviparus-Larven eine 12 tägige Gefrierperiode mit Tiefsttemperaturen bis -14°C. Als dieses Präparat anschließend 4 Wochen lang in den Kühl-

schrank gestellt wurde, fand ich immer noch 5% überlebende Larven. Es kann also sehr wohl eine kleine Anzahl Larven längere Kälteperioden überstehen, eine Überwinterung in größerem Umfange scheint aber ausgeschlossen.

In allen meinen Untersuchungen haben sich Pferdestrongylidenlarven als besonders widerstandsfähig erwiesen. Bei Abschluß von zwischen dem 5.11.1965 und 17.4.1966 laufenden Freilandversuchen ließen sich noch 1o% der Strongylus vulgaris- und 6% der Trichonemen - Larven nachweisen. Diese Prozentzahlen sind nicht erstaunlich, wenn man bedenkt, daß RAFFENSBERGER (zit. ENIGK, 1934) auf einer 7 Jahre lang nicht begrasten Koppel lebende Pferdestrongyliden-Larven nachweisen konnte. Auch RICHTERS und FRISCHBIER (193o) fanden im Freien noch nach 16 Monaten lebende Strongylus-, BARUS (1963) Trichonema-Larven.

Warum einzelne Larvenarten Gefriertemperaturen besser vertragen als andere, ist bis heute ungeklärt. Auch die von LUYET und GEHENIO (194o), SMITH (1954) und SALT (1961) mitgeteilten Ursachen für Kälteschäden geben lediglich Hinweise. SAYRE (1964) glaubt, daß die größere Viskosität in den gefrierresistenten Nematoden die Bildung nur sehr kleiner Eiskristalle zuläßt, von denen SMITH (1961) annimmt, daß sie die Zellen nicht schädigen. Daß die von mir bei längere Zeit eingefrorenen Pferdestrongyliden-Larven beobachteten Luftblasen im Darm vielleicht einen wirksamen Mechanismus zum Überstehen von Gefriertemperaturen darstellen, läßt sich lediglich vermuten.

V. Zusammenfassung

Es wurde versucht, Infektionslarven verschiedener Trichostrongyliden (Haemonchus, Ostertagia, Trichostrongylus, Cooperia) und Chabertia ovina , des Rinderlungenwurmes (Dictyocaulus viviparus) sowie großer und kleiner Pferdestrongyliden (Strongylus vulgaris, Trichonema spp.) im Tiefgefrierverfahren über längere Zeit lebend zu erhalten. Trotz Zusatz verschiedener Glyzerin oder Dimethyloxyd enthaltender Schutzmedien war eine verläßliche Gefrierkonservierung der Helminthenstadien nicht möglich.

In zusätzlichen Laborversuchen wurde die Lebensdauer dieser ansteckungsfähigen Larven in Aqua dest. und im Kot bei Temperaturen von 18-2o°C, von 4°C, von -2o°C sowie von -76°C untersucht und mit deren Überlebensrate in Feldversuchen verglichen.

Die Möglichkeit der Überwinterung konnte bestätigt werden für einen großen Prozentsatz der Larven III von Ostertagia, Strongylus vulgaris und Trichonema spp. Bei den während des Winters 1965/66 in Berlin herrschenden Temperaturen waren die Larven von Dictyocaulus viviparus im Höchstfalle 8 Wochen lebensfähig.

VI. Literaturverzeichnis

1. ALLAN, D., J.T. BAXTER (1957): On the overwintering on pasture of Dictyocaulus viviparus larvae in Northern Ireland. Vet. Rec. 69, 717-718

2. ALTAEV, A.K. (1961): Observations on the development of freeliving larvae of Trichostrongylus skrjabini. Tr. gelmint. Labor. Akad. Nauk.SSSR 11, 10-21

3. ANDERSON, F.L., N.D. LEVINE u. W.C. MARQUARD (1964): Overwinter survival on pasture of trichostrongylide nematode of sheep. J. Parasit. 50 (Sect. 2 Suppl.), 35

4. ASHWOOD-SMITH, M.J. (1961): Preservation of mouse bone marrow at -79°C with dimethyl sulfoxide. Nature 190, 1204-1205

5. BAKER, D.W. (1939): Survival of worm parasite infection on New York State pastures. Cornell Vet. 29, 45-48

6. BARNETT, S.F. (1964): The preservation of Babesia bigemina, Anaplasma centrale, and A. marginale by deep freezing. Vet. Rec. 76, 4-8

7. BARUS, V. (1963): Vývojové cykly nekterých hlistic z celedi Trichonematidae Witenberg 1925 v laboratornich a terénnich podminkách. Csl. Parasit. 10, 23-42

8. BELL, R.R., T.J. GALVIN u. R.D. TURK (1960): Survival on pasture of infective lárvae of Cooperia pectinata and Ostertagia ostertagi. Amer. J. Vet. Res. 21, 1101-1103

9. BEMRICK, W.J. (1961): Effect of low temperatures on trophozoites of Giardia muris. J. Parasit. 47, 573-576

10. BESCH, E.D. (1964): The effects of time and temperature on the infectivity of third-stage larvae of Cooperia punctata (Trichostrongylidae) in the domestic rabbit, Oryctolagus cuniculus L.
Amer. J. Vet. Res. 25, 535-537

11. BESSONOW, A.S. (1958): Study of the development of Ostertagia ostertagi larvae and their resistance under field conditions in the West Kazakhstan region. Bjull. Nauc.-Tekh. Inform. Vsesc. Inst. gelmint. Akad. K.I. Skrjabina 4, 20-24

12. BORCHERT, A., W. TIMM (1949): Beobachtungen über die Lungenwurmkrankheit des Schafes und Untersuchungen über die Überwinterung der Larve von Dictyocaulus filaria.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. S. 169-173

13. BORODINA, V.V. (1957): Conditions and ways in which sheep become infected with Dictyocaulus.
Veterinarija 34, 38-40

14. CROFTON, H.D. (1948): The ecology of immature phases of trichostrongyle nematodes. I. The vertical distribution of infective larvae of Trichostrongylus retortaeformis in relation to their habitat.
Parasitology 39, 17-25

15. CROFTON, H.D. (1948): II. The effect of climatic factors in the availability of the infective larvae of T. retortaeformis to the host.
Parasitology 39, 26-38

16. CUNNINGHAM, M.P., W.H.R. LUMSDEN u. W.A.F.WEBBER (1963): Preservation of viable trypanosomes in lymph tubes at low temperature .
Exp. Parasit. 14, 280-284

17. DIKMANS, G., J.S. ANDREWS (1933): A note on the time of survival of larvae of Haemonchus contortus, Ostertagia circumcincta, and Nematodirus spathiger on pasture. J. Parasit. 2o, 1o7

18. DINABURG, A.G. (1944): The survival of the infective larvae of the common ruminant stomach worm, Haemonchus contortus, on outdoor grass plots. J. Vet. Res. 5, 32-37

19. DINABURG, A.G. (1945): The effect of low outdoor temperatures on the freeliving stages of some common nematode parasites of sheep. J. Vet. Res. 6, 257-263

20. DOUGHERTY, R.M. (1962): Use of dimethyl sulfoxide for preservation of tissue culture cells by freezing. Nature 193, 55o-552

21. ENIGK, K. (1934): Über die Widerstandsfähigkeit der Entwicklungsstadien der Strongyliden außerhalb des Wirtstieres. Arch. wiss. prakt. Tierhk. 67, 363-376

22. ENIGK, K., D. DÜWEL (1961): Die Lebensdauer der ansteckungsfähigen Larven des Rinderlungenwurms. Tierärztl. Umsch. 16, 415-418

23. ERHARDOVA, B. (1962): Prispevek k ekologii cizopasnych cervu prezvykavcu. Csl. Parasit. 9, 191-199

24. FURMAN, D.P. (1944): Effects of environment upon the free-living stages of Ostertagia circumcincta (Stadelmann) Trichostrongylidae: I. Laboratory Experiments. Amer. J. Vet. Res. 5, 79-86

25. GEORGIEW, B. (1956): The biology of Dictyocaulus filaria. Sbornik Nauc. tr. vet. inst. Minist. Zemed. Sofia 6, 275-282 (russ.)

26. GOLDBERG, A., J.T. LUCKER (1959): Survival on pasture of larvae of gastrointestinal nematodes of cattle. II. Spring contamination Proc. Helminth. Soc. Wash. 26, 37-42

27. GOLDBERG, A., J.T. LUCKER (1963): Survival on pasture of larvae of gastrointestinal nematodes of cattle III. Fall contamination J. Parasit. 49, 435-442

28. GOLDBERG, A., R. RUBIN (1956): Survival on pasture of larvae of gastrointestinal nematodes of cattle. Proc. Helminth. Soc. Wash. 23, 65-68

29. GRIFFITHS, H.J. (1937): Some observations on the overwintering of certain helminth parasites of sheep in Canada. Canad. J. Res. Sect. D, 15, 156-162

30. HELLE, O. (1963): Overvintring av de vanligste saueparasitter i Norge. Nordic Veterinary Congress, Copenhagen, Juli 4-7, 1962, Proceedings. 9 Vol.I, 211-215

31. HERLICH, H. (1966): Effects of cold storage on the infectivity of third-stage larvae of the intestinal worm, Trichostrongylus colubriformis (Giles 1892) Ransom 1911. Proc. Helminth. Soc. Wash. 33, 101-102

32. HOPPENRATH, J.G. (1956): Versuche zur Konservierung von lebenden Trypanosomen, Trichomonaden, Toxoplasmen mittels Tiefkühlung und Vakuumgefriertrocknung. Vet. med. Diss. Giessen

33. JAHNEL, F. (1938): Über die Widerstandsfähigkeit von menschlichen Spermatozoen gegenüber starker Kälte. Klin.Wschr. 17, 1273-1274

34. JARETT, W.F.H., W.I.M. MC INTYRE u. G.M. URQUHART (1954): Husk in cattle. Vet. Rec. 66, 665-676

35. KATES, K.C. (1943): Overwinter survival on pasture of preparasitic stages of some nematodes parasitic in sheep. Proc. Helminth. Soc. Wash. 10, 23-25

36. KATES, K.C. (1950): Survival on pasture of freeliving stages of some common gastrointestinal nematodes of sheep. Proc. Helminth. Soc. Wash. 17, 39-58

37. KITE, J.H., G.F. DOEBBLER (1962): A simple procedure for freezing and storage of tissue cultures using liquid nitrogen. Nature 196, 591-592

38. LOVELOCK, J.E., M.W.H. BISHOP (1959): Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. Nature 183, 1394-1395

39. LUCKER, J.T. (1941a): Notes on the survival of infective horse strongyle larvae. Proc. Helminth. Soc. Wash. 8, 11-13

40. LUCKER, J.T. (1941 b): Survival and development at low temperatures of eggs and preinfective larvae of horse strongyles. J. Agric. Res. 63, 193-218

41. LUYET, B.J., F.M. GEHENIO (1940): Life and death at low temperatures. Normandy, Missouri, U.S.A. Biodynamica, 341 pp.

42. MC ENTEGART, M.G. (1954): The maintance of stock strains of trichomonads by freezing.
J. Hyg. 52, 545-556

43. MÖNNIG, H.O. (1930): Studies on the bionomics of the freeliving stages of Trichostrongylus spp. and other parasitic nematodes.
Rep. Dir. Vet. Serv.& Anim. Ind. Pretoria 16, 175-198

44. MÜHLPFORDT, H. (1960): Der Einfluß tiefer Temperaturen auf Protozoen.
Z. Tropenmed. Parasit. 11, 481-507

45. NAGINGTON, J., R.I.N. GREAVES (1962): Preservation of tissue culture cells with liquid nitrogen.
Nature 194, 993-994

46. NEKIPELOVA, R.A. (1956): The migration and survival of trichostrongylid larvae of sheep in the Alma-Ata region.
Probl.Parazit. (Transactions of the Scientific Conference of Parasitologists of the Ukrainian S.S.R.) 2, 90-91

47. OBER-BLÖBAUM, W. (1932): Untersuchungen über die Einwirkungen physikalischer Einflüsse auf die Larven von Pferdestrongyliden
Tierärztl. Rdsch. 38, 812-815

48. PERSIDSKY, M., V. RICHARDS (1963): Optimal conditions and comparative effectiveness of dimethyl sulfoxide and polyvinyl-pyrrolidone in preservation of bone marrow.
Nature 197, 1010

49. POLGE, C.A., A.S. PARKES (1952): Possibilities of longterm storage of spermatozoa at low temperatures.
Anim. Breed. Abstracts 20, 1-5

50. POLGE, D., A.U. SMITH u. A. PARKES (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.
Nature 164, 666

51. POLGE, C., M.A. SOLTYS (1957): Preservation of trypanosomas in the frozen state.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 51, 519-526

52. PORTER, D.A. (1942): On the survival of the preparasitic stages of the cattle lungworm on pastures.
Proc. Helminth. Soc. Wash. 9, 6o-62

53. PORTERFIELD, J.S., M.J. ASHWOOD-SMITH (1962): Preservation of cells in tissue culture by glycerol and dimethyl sulfoxide.
Nature 193, 548-55o

54. REINECKE, R. (196o): A field study of some nematode parasites of bovines in a semi-arid area, with special reference to their biology and possible methods of prophylaxis.
Onderstepoort J. Vet. Res. 28, 365-464

55. REUSSE, U. (1956): Konservierung einiger tierpathogener Protozoen durch Aufbewahrung bei tiefen Temperaturen.
Z. Tropenmed. Parasit. 7, 99-1o9

56. RICHTERS, A. FRISCHBIER (193o): Die Bekämpfung der Sklerostomiasis des Pferdes vom Standpunkt der Hygiene und Therapie.
Berl. tierärztl. Wschr. 46, 493-5o2

57. ROBL, V. (1965): Untersuchungen über die Möglichkeit der Lebendkonservierung von Toxoplasmen bei tiefenTemperaturen.
Vet. med. Diss. F.U. Berlin

58. ROSE, J.H. (1955): Observations on the bionomics of the freeliving larvae of the lungworm Dictyocaulus filaria.
J. Comp. Path. 65, 37o-381

59. ROSE, J.H. (1956): The bionomics of the freeliving larvae of Dictyocaulus viviparus.
J. Comp. Path. 66, 228-240

60. ROSE, J.H. (1961): Some observations on the freeliving stages of Ostertagia ostertagi, a stomach worm of cattle.
Parasitology 51, 295-307

61. ROSE, J.H. (1963 a): Observations on the freeliving stages of the stomach worm Haemonchus contortus.
Parasitology 53, 469-481

62. ROSE, J.H. (1963 b): Ecological observations and laboratory experiments on the freeliving stages of Cooperia oncophora.
J. Comp. Path. 73, 285-296

63. ROSE, J.H. (1964): Aspects of the biology of the freeliving stages of some gastro-intestinal nematodes of cattle.
Parasitology (Proceedings) 54, 2-3

64. ROSE, J.H. (1965): The rested pasture as a source of lungworm and gastro-intestinal worm infection for lambs.
Vet. Rec. 77, 749-752

65. ROSE, J.H., J.F. MICHEL (1957): Quantitative studies on the contamination of pasture herbage with husk worm larvae.
J. Comp. Path. 67, 57-68

66. RYAZANTSEV, V.F. (1952): Duration of viability of parasitic larvae of Strongylidae in the soil.
Veterinarija 29, 45

67. SARLES, M.P. (1943): Overwinter loss of Haemonchus contortus larvae from a sheep pasture.
Proc. Helminth. Soc. Wash. 10, 22-23

68. SAYRE, R.M. (1964): Cold-hardiness of nematodes. I. Effect of rapid freezing on the eggs and larvae of Meloidogyne incognita and M. hapla. Nematologica 1o, 168-179

69. SCHWINK, T.M. (1963): Development and survival of some roundworm larvae of cattle at high altitudes in Wyoming. Proc. Helminth. Soc. Wash. 3o, 15-18

70. SEGHETTI, L. (1948): The effect of environment on the survival of the free-living stages of Trichostrongylus colubriformis and other nematode parasites of range sheep in southeastern Montana. Amer. J. Vet. Res. 9, 52-6o

71. SHORB, D.A. (1942): Survival of sheep nematodes in pastures. J. Agric. Res. 65, 329-337

72. SHORB, D.A. (1943): Survival on grass plots of eggs and preinfective larvae of the common sheep stomach worm, Haemonchus contortus. J. Parasit. 29, 284-289

73. SHORB, D.A. (1944): Survival on grass plots of eggs and larvae of the stomach worm, Haemonchus contortus. J. Agric. Res. 68, 317-324

74. SMITH, A.U. (1954): Effects of low temperatures on living cells and tissues. Biological applications of freezing and drying. R.J.C. Harris New York N.Y. Academic Press, 1-62 pp.

75. SMITH, A.U. (1961): Biological effects of freezing and supercooling. Edward Arnold (Publishers) Ltd. London 462 pp.

76. SMITH, A.U., POLGE, C. (1950): Storage of bull spermatozoa at low temperatures.
Vet. Rec. 62, 115-116

77. SOLIMAN, K.N. (1952): Observations on the survival on pasture of preparasitic stages of Dictyocaulus viviparus in southern England (I).
Brit. Vet. J. 108, 167-172

78. SPENGLER, R. (1955): Die Lebensfähigkeit von Eiern und Larven der wichtigsten Wurmparasiten unserer Haustiere an Futtermitteln vor und nach der Trocknung.
Vet. med. Diss. München

79. STABLEFORTH, A.W. (1953): Recent advances at Weybridge.
Vet. Rec. 65, 709-715

80. SWALES, W.E. (1940): The helminth parasites and parasitic diseases of sheep in Canada.
II. Notes on the effect of winter upon the freeliving stages of nematode parasites of sheep on the pastures in eastern Canada.
Canad. J. Comp. Med. 4, 155-161

81. SWIETLIKOWSKI, M. (1959): Badania nad epizootiologica robaczycy plucnej bydla.
Acta parasit. pol. 7, 249-305

82. TAYLOR, E.L. (1938): Observations on the bionomics of strongylid larvae in pastures.
Vet. Rec. 50, 1265-1272

83. THRELKELD, W.L. (1948): The life history and pathogenicity of Chabertia ovina.
Techn. Bull. Va. Agric. Exp. Sta.
111, 20-21

84. VEGORS, H.H. (1963): Effect of sudden lowering of temperature on survival of infective larvae of Dictyocaulus viviparus.
J. Parasit. 49 (Sect.2 Suppl.), 44

85. VERCRUYSSE, R. (1952): Hebben infectieuze larven van Dictyocaulus viviparus de Winterperiode 1951/52 overleefd?
Vlaams diergeneesk. T. 21, 183-187

86. WALKER P.J., M.J. ASHWOOD-SMITH (1961): Dimethyl sulfoxide, an alternative to glycerol for the low temperature preservation of trypanosomes.
Ann. trop. Med. Parasit. 55, 93-96

87. WEINMAN, D., J. MC ALLISTER (1947): Prolonged storage of human pathogenic protozoa with conservation of virulence; observations on the storage of helminths and leptospiras.
Amer. J. Hyg. 45, 102-121

88. WETZEL, R. (1945): Überwintern die ansteckungsfähigen Larven des großen Lungenwurms und der Magenwürmer der Schafe auf der Weide.
Tierärztl. Zeitschr. S. 7-9

89. WETZEL, R. (1948): Zur Epidemiologie des Lungenwurmbefalls bei Rindern.
Mh. Vet.-Med. 3, 141-148

Herrn Professor Dr. J. Boch, meinem hochverehrten Lehrer, möchte ich für die Überlassung des Themas und das Interesse, das er meiner Arbeit jederzeit entgegenbrachte, meinen Dank aussprechen.

Danken darf ich auch Herrn Dr. F. Hörchner und allen Angehörigen des Institutes, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und die Durchführung meiner Versuche unterstützten.

Lebenslauf

Am 26. Dezember 1939 wurde ich, Antje Meyer-Golling, als Tochter des Lehrers Traugott Meyer-Golling und seiner Ehefrau Käthe, geb. Golling, in Neuruppin geboren.

Von 1945 bis 1950 besuchte ich die Grundschule in Neuruppin, anschließend in Berlin-Zehlendorf je ein Jahr die Beuckeschule und die Nordschule. Im Frühjahr 1960 bestand ich an der Droste-Hülshoff-Schule die Reifeprüfung.

Zum Sommersemester 1960 wurde ich als Studentin der Veterinär-Medizin an der Freien Universität Berlin immatrikuliert. Im Jahre 1962 bestand ich das Physikum und am 3. Mai 1965 das Staatsexamen.